

Aus dem Arbeitskreis Alkoholkonsum und Nachtrunk der GTFCh

Bestandsaufnahme der Begleitstoffanalyse und Ergebnisse erster Ringversuche

K. Schulz^a, J. Teske^b, T. Gilg^c, R. Aderjan^d und M. Herbold^e, unter Mitarbeit der Mitglieder des Arbeitskreises*

^a Institut für Rechtsmedizin der Technische Universität Dresden, ^b Institut für Rechtsmedizin der Medizinische Hochschule Hannover, ^c Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München, ^d Institut für Rechts- und Verkehrsmedizin der Universität Heidelberg, ^e ARVECON GmbH Walldorf

Zusammenfassung

Im Rahmen der Begleitstoffanalyse kommen unterschiedliche Probenvorbereitungen und auch unterschiedliche Durchführungen der Headspace-Analyse und der Chromatographie zum Einsatz. Zusätzlich wird biologisches Material untersucht, das zum Teil schwierig zu handhaben ist. Dennoch konnte anhand der Ergebnisse der Ringversuche gezeigt werden, dass Begleitstoffanalytik auch mit unterschiedlichen Durchführungen eine zuverlässige Methode zu Bestimmung der relevanten Analyten darstellt.

Abstract

In congener analysis different sample preparation techniques and varying methods of headspace analysis and chromatography are used. Biological material, which is rather difficult to handle, is used. Nevertheless, congener analysis is a very reliable technique for the investigation of relevant analytes also with different methods, which could be shown by results of proficiency tests.

1. Einleitung

Die Begleitstoffanalyse gehört seit langem zum Standardrepertoire der rechtsmedizinischen Institute [1]. Die Durchführung dieser Analysen unterscheidet sich von Labor zu Labor zum Teil sehr deutlich.

Der Arbeitskreis Alkoholkonsum und Nachtrunk der GTFCh hat in den vergangenen zwei Jahren insgesamt fünf Ringversuche von insgesamt 16 teilnehmenden Instituten ausgewertet, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen. Weiterhin wurden mit dem Ziel der Erfassung des derzeitigen Status der Begleitstoffanalyse die Details hinterfragt und im Sinne einer Bestandsaufnahme aufgelistet. Diese Einzelheiten der verwendeten Analysemethoden wurden den bisherigen Ringversuchsergebnissen gegenübergestellt.

Zu einem späteren Zeitpunkt sollen Empfehlungen zur Durchführung dieser Analysen veröffentlicht und die unterschiedlichen Aufarbeitungen gegebenenfalls angeglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Die polizeilich erhobenen Blutproben werden in allen Labors zunächst zentrifugiert und der Überstand wird der Blutalkoholanalyse zugeführt. Die Proben werden anschließend bei 4 °C im Kühlschrank gelagert; in Einzelfällen wird das Serum getrennt eingefroren. Oft erst Wochen bis Monate später wird die Durchführung einer Blutbegleitstoffanalyse staatsanwaltschaftlich angeordnet. Zu diesem Zeitpunkt entspricht der Überstand der zentrifugierten Blut-

* *Anschrift für die Verfasser:* Dr. rer. nat. Katja Schulz, Institut für Rechtsmedizin der Technischen Universität Dresden, Fetscherstr. 74, 01307 Dresden.

probe – abhängig von der Zeitdauer und den Umständen der Lagerung – Serum mit unterschiedlich starkem Hämolysegrad. Werden zwischenzeitlich noch weitere Untersuchungen der Blutprobe durchgeführt (BTM, Medikamente), ist möglicherweise nur noch „Restblut“ oder Blutkuchen für eine Begleitstoffanalyse vorhanden. Die unterschiedlich beschaffene Matrix stellt ein Problem für die Begleitstoffanalyse dar.

Die Menge des verwendeten Probenmaterials für eine Einzelbestimmung schwankt bei den befragten Instituten zwischen minimal 100 µl und maximal 1000 µl.

2.2 Methoden

Die Blutbegleitstoffanalytik wird grundsätzlich mittels Headspace-Gaschromatographie (HS-GC) durchgeführt. Standardgemäß wird als Detektor der Flammenionisationsdetektor (FID) verwendet. Bedingt durch den relativ hohen Dampfdruck der zu bestimmenden Analyten, der eleganten Abtrennung der Analyten von der schwerflüchtigen Matrix und der guten Empfindlichkeit der Gaschromatographie mit FID-Detektion wird die HS-GC als Methode der Wahl durchgeführt. In Tabelle 1 sind die wichtigsten Methodenparameter der Labore 1 – 16 dargestellt.

Tabelle 1: Methodenparameter vs. Ringversuchsergebnisse. s = Serum, b = Blut, w = wässrig, K = Kapillarsäule, G = gepackte Säule, - = keine Aussage möglich.

Labor	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
HS-GC/FID	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
HS-Hochdruck		x				x	x	x								
HS-Kryo		x						x	x							
Probe	s	b	b/s	s	s	s	s	b	b/s	b/s	b/s	b	b/s	s	s	s
Probenmenge [µl]	200	250	1000	1000	100	400	250	200	1000	1000	1000	200	1000	500	500	100
Aussalzen	x	x		x	x	x	x	x		x	x	x	x		x	x
Glucuronidspaltung		x	x	x		x			x							
Ultrafiltration		x	x		x				x			x				
Eiweißfällung							x				x					
Kalibration	s	w	w	s	w	w/s	w/s	w	b	w	w	w	s/b	w	s	w/s
Kalibrationspunkte ≥ 3	x	x	x	x		x		x	x	x	x	x			x	x
Kalibrationspunkte < 3					x		x						x	x		
ISTD-tert-Butanol	x	x		x	x	x	x			x		x		x		x
ISTD-2-Pentanol			x					x	x			x	x	x		
Miniaturisierte Meth.					x				x			x				x
Trennsäulen	K	K	K	G	K	K	K	K	K	K	G	K	K	G/K	K	G/K
Isotherme Messung														x		
Teilnahme an RV	5	1	5	2	5	5	4	5	0	3	5	5	4	4	5	2
nicht zertifizierte Analyten insgesamt	2	0	4	3	2	0	1	5	-	1	8	7	5	5	0	1

Die Headspace-Gaschromatographie wird dabei als „normale“ Headspace-GC (11 Institute), als Hochdruck-Headspace-GC (2 Institute), als Headspace-GC mit Kryofokussierung (1 Institut) und als Kombination aus Hochdruck-Headspace-GC mit Kryofokussierung (2 Institute) durchgeführt. Die Probenvorbereitung reicht von „ohne“ (1 Institut) über nur eine Art der

Probenvorbereitung (6 Institute; hier nur Aussalzen) bis hin zu drei gleichzeitigen Probenvorbereitungen. Von 13 der 16 Institute wird die Probe ausgesalzt, fünf Institute führen eine Glucuronidspaltung durch, fünf eine Ultrafiltration, zwei eine Eiweißfällung. Sieben Institute wählen eine Kombination aus zwei Arten der Probenvorbereitung (fünf davon in Kombination mit Aussalzen) und ein Institut betreibt eine dreistufige Probenvorbereitung (Glucuronidspaltung, Ultrafiltration und Aussalzen).

Nach der Art der Probenvorbereitung richtet sich die Wahl der Kalibratoren (wässrig, Serum, Vollblut), da die Matrixeffekte in Kalibrationslösung und zu untersuchender Probe identisch sein sollten. Deshalb wird von den Instituten, die als Probenvorbereitung eine Ultrafiltration oder Eiweißfällung wählen, eine wässrige Kalibration durchgeführt. Die übrigen Institute verwenden in der Regel für Kalibrator und Probe die gleiche Matrix. Als innerer Standard werden tert-Butanol bzw. 2-Pentanol eingesetzt, wobei tert-Butanol doppelt so häufig wie 2-Pentanol verwendet wird; eine Kombination von beiden inneren Standards wird von zwei der 16 Institute gewählt. Die zugesetzte Menge an innerem Standard pro Probe beträgt 100 bis 1000 ng absolut.

Die Erstellung der Kalibrationskurve erfolgt von den meisten Instituten mit mindestens drei Kalibrationspunkten pro Substanz. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgt automatisch; beim Einsatz der überwiegend verwendeten Perkin Elmer-Analysentechnik mittels Turbochrom- oder Total Chrom-Software.

Üblicherweise werden – bedingt durch die Geometrie des Headspace-Autosamplers - 22 ml Headspace-Vials verwendet. Zwei der 16 Institute verwenden die von Wolf und Weller entwickelte Mikro-Headspace-Methode [2, 3] mit 0,8 ml Vials. Zwei weitere Institute haben ihre Headspace-Methode ebenfalls miniaturisiert, indem sie 2 ml Vials benutzen. Außerdem finden einmal 5 ml Vials und zweimal 10 ml Vials Verwendung. Die miniaturisierte Arbeitsweise wird gemeinsam mit einer automatischen Headspace-Spritzendosierung eingesetzt. Die Septen der Vials sind teflonbeschichtet und werden gleichermaßen mit und ohne Vorbehandlung (ausheizen, auskochen) verwendet.

Als chromatographische Trennsäulen werden von 14 der 16 Institute Kapillarsäulen verwendet (meist mittelpolare bis polare Säulen unterschiedlicher Hersteller und Geometrie); zwei Institute verwenden gepackte Säulen; zwei weitere Institute verwenden zusätzlich zu Kapillarsäulen auch gepackte Säulen. Zusätzlich wird mit Paralleldetektion gearbeitet; dabei wird das injizierte Dampfraumvolumen gleichzeitig auf zwei verschiedenen Säulen getrennt.

Lediglich ein Institut untersucht die Begleitstoffe isotherm; ansonsten werden individuell erstellte Temperaturprogramme verwendet. Allen gemeinsam ist eine niedrige Starttemperatur mit geringer Heizrate zur Fokussierung und ausreichenden Auftrennung der leichtflüchtigen Begleitstoffe.

Die Konzentrationsbestimmung der Begleitstoffe erfolgt bei nahezu allen Instituten für Methanol, Aceton, 1-Propanol, 2-Butanol, 2-Butanon, Isobutanol, 1-Butanol, 3-Methyl-1-butanol und 2-Methyl-1-butanol sowie zusätzlich von einigen Instituten für Acetaldehyd und Isopropanol. Die Begutachtung beschränkt sich in der Regel auf die Begleitstoffe Methanol, 1-Propanol, 2-Butanol, Isobutanol sowie 3-Methyl-1-butanol, gegebenenfalls mit 2-Methyl-1-butanol als Summenwert, (ansonsten entsprechend den Korrelationsformeln nach Bonte) sowie insbesondere 1-Butanol als Fäulnismarker.

Im Rahmen der Begleitstoffanalyse wird die Ethanolbestimmung mit separater Methode meist wiederholt, um z. B. Lagerungsveränderungen und Verdunstungsverluste festzustellen.

Im Rahmen einer Messsequenz werden Leerwerte und Kontrollproben mit bestimmt. Ebenso erfolgt – sofern erforderlich - eine Begleitstoffbestimmung in den 1:10 bis 1:100 (ggf. bis 1:500) verdünnten Getränkeproben.

3. Messwerte – Ergebnisse der Ringversuche

Die Ringversuchsergebnisse sind Tabelle 1 zu entnehmen. Dabei wurden die Anzahl der Teilnahmen der bisher durchgeführten fünf Ringversuche sowie die nicht zertifizierten Analyten des jeweiligen Labors über die Anzahl der teilgenommenen Ringversuche aufsummiert. Ethanol wurde in dieser Auswertung nicht berücksichtigt, da es ohnehin separat bestimmt wird.

Die statistische Auswertung der Ringversuche wurde unter wissenschaftlicher Leitung von Prof. Dr. R. Aderjan durch die Firma Arvecon organisiert und durchgeführt [4, 5, 6]. Als Bewertungsgrundlage für die erfolgreiche Teilnahme am Ringversuch wurde der ausreißerfreie Mittelwert der Teilnehmer und die zweifache Standardabweichung SD_{RV} ($SD_{Horwitz}$) angewandt. Der z-score wurde nach folgender Formel berechnet und auf zwei Nachkommastellen gerundet.

$$z\text{-score} = \frac{\text{Ergebnis des RV} - \text{Teilnehmers-Sollwert}}{SD_{RV}}$$

Das Zertifikat wurde für den jeweiligen Analyten bei einem z-score von $< |2,00|$ erteilt. Für die Institute, bei denen in den Ringversuchen insgesamt mindestens fünf Analyten nicht zertifiziert wurden, soll in der Diskussion nach eventuellen Fehlerquellen gesucht werden.

4. Diskussion

Die Diskussion der ermittelten Ergebnisse muss zurückhaltend erfolgen, da für statistisch gesicherte Aussagen insgesamt zu wenig Daten (16 Labore, 5 Ringversuche mit jeweils 7 Analyten) zur Verfügung stehen. Sie soll deshalb allgemein erfolgen und unterstützend die vorliegende Bestandsaufnahme mit verwenden.

In Tabelle 2 sind die nicht zertifizierten Analyten insgesamt – aufgeschlüsselt auf die einzelnen Analyten - aller an der Bestandsaufnahme mitgewirkten Labore der bisher durchgeführten fünf Ringversuche aufgelistet.

Tabelle 2: Summe der z-score und Gesamtteilnahmen

Analyt	Summe z-score $\leq 2 $	N_{ges}
Methanol	7	60
1-Propanol	5	60
2-Butanon	4	60
2-Butanol	0	60
Isobutanol	3	60
1-Butanol	5	60
Methylbutanole	6	60

Aus Tabelle 2 ist zu entnehmen, dass für die Analyten Methanol, 1-Propanol, 1-Butanol und die Methylbutanole jeweils fünfmal und mehr kein Zertifikat erteilt wurde. Die Fehler traten gleichmäßig verteilt auf die Ringversuche auf (ohne Tabelle). Ebenfalls konnten systematische Fehler der einzelnen Labore für einen oder mehrere Analyten nicht festgestellt werden (ohne Tabelle). Für die Qualität der Ergebnisse scheint unerheblich zu sein, ob die

Headspace-Technik ohne weiteres Zubehör oder mit Hochdruckdosierung und Kryofokussierung durchgeführt wird.

Die Probenvorbereitung dagegen – insbesondere der Aussalzeffekt – ist von großer Bedeutung. Wird kein Aussalzen durchgeführt, sollte zumindest eine andere Methode der Empfindlichkeitssteigerung durchgeführt werden (z.B. Kryofokussierung oder Einsatz von deutlich größerer Menge an Probenmaterial und/oder kleinerem Dampfraum, um das Phasenverhältnis günstiger zu gestalten).

Die Verwendung unterschiedlicher Matrices für Kalibrator und Probe hat Einfluss auf die Analyseergebnisse, kommt aber bei Verwendung von Ringversuchsserum gegenüber (in Einzelfällen durchgeführter) wässriger Kalibration nicht derart zum Tragen, dass einzelne Analyten systematisch nicht zertifiziert würden.

Regelmäßige Kalibration und Kontrollmessungen zur internen Qualitätskontrolle sowie die Teilnahme von Ringversuchen zur externen Qualitätskontrolle sind ebenso wichtig wie Absicherung der Messergebnisse durch Mehrfachbestimmung.

Die Qualität der Trennsäule (Polarität und derzeitige Beschaffenheit der Säule) ist erwartungsgemäß das wichtigste Kriterium zur erfolgreichen Chromatographie der Begleitstoffe. Die Einzelsubstanzen müssen ausreichend voneinander getrennt werden (Ausnahme 2- und 3-Methylbutanol, die als Summe erfasst werden), was durch die meisten mittelpolaren und polaren Säulen ermöglicht wird. Die Qualität der Säule bzw. des Chromatogramms konnte durch die Bestandsaufnahme leider nicht erfasst werden. Peak tailing, Diskriminierungen und schlechte Trennleistungen würden die Qualität der Begleitstoffanalyse erheblich beeinträchtigen.

Die Geometrie der Trennsäule ist zumindest im niedrigeren Konzentrationsbereich von entscheidender Bedeutung. Kapillarsäulen haben eine höhere Trennleistung als gepackte Säulen und erzielen durch ein günstigeres Signal/Rausch-Verhältnis folglich niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen.

Literatur

- [1] Bonte W (1987) Begleitstoffe alkoholischer Getränke. Verlag Max Schmidt-Römhild, Lübeck
- [2] Wolf M, Urban R, Weller J-P, Tröger HD (1985) Blutalkohol 22: 321-332
- [3] Wolf M, Weller J-P, Urban R, Tröger HD (1987) Blutalkohol 24: 378-391
- [4] Herbold M, Schmitt G, Aderjan R (2003) Auswertung forensischer Ringversuche nach ISO 5725. In: Symposium der GTFCh, Mosbach/Baden, Hrsg. F. Pragst, R. Aderjan, Dr. Dieter Helm Verlag, Heppenheim, S. 343-347.
- [5] Schmitt G, Aderjan R (2004) Blutalkoholbestimmung – Validierung und Ermittlung der Messunsicherheit gemäß internationalen Standards. Blutalkohol 41: 299-318
- [6] Doerffel K (1990) Statistik in der analytischen Chemie. Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig